

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 816 711

②① N° d'enregistrement national : **00 14691**

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/531, G 01 N 33/543

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 15.11.00.

③⑩ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.05.02 Bulletin 02/20.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑩ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *BIOMERIEUX Société anonyme —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : COLIN BRUNO.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ PROCÉDE DE DEPOT D'UNE SOLUTION D'ANALYTE.

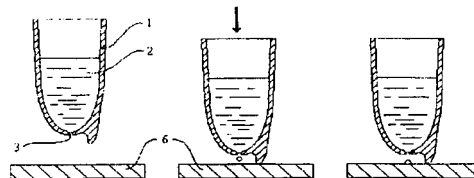
⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de dépôt
d'une solution (2) contenant au moins un analyte sur un
support (6) comprenant les étapes suivantes:

a) charger la solution (2) dans au moins un réservoir (1)
d'un dispositif, chaque réservoir étant muni à une extrémité
d'un orifice de sortie (3) de dimensions adaptées pour que
la solution ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir
est au repos.

b) provoquer le déplacement du réservoir (1) entre deux
positions, une position dite de départ et une position dite
d'arrivée, selon un axe et

c) stopper le déplacement lorsque ledit réservoir (1) se
trouve en position d'arrivée pour créer un choc mécanique
sur le réservoir et déposer via l'orifice de sortie, une goutte
de solution sur le support solide, ladite goutte se déplaçant
dans l'air avant de se déposer sur le support solide.

La présente invention décrit également un dispositif
pour la mise en oeuvre du procédé et trouve son application
préférentielle pour la fabrication de biopuces.



FR 2 816 711 - A1



DESCRIPTION

La présente invention concerne un procédé de dépôt d'une solution d'un analyte sur un support et un dispositif pour la mise en œuvre du procédé.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses méthodes ont été développées pour la fixation d'analytes et notamment des acides nucléiques ou des peptides sur support solide, notamment pour la fabrication de biopuces.

Une premier type de méthode consiste à réaliser in situ la synthèse des analytes pour fabriquer une biopuce. A cet effet, le brevet US 5,744,305 décrit une méthode d'assemblage d'oligonucléotides par photolithographie à partir de nucléotides protégés par un groupement photolabile. La demande de brevet WO 95/25116 décrit la technique du jet d'encre pour amener les réactifs de synthèse d'oligonucléotides sur le support toujours pour la synthèse in situ. Ces méthodes permettent de préparer des biopuces avec une densité importante d'analytes sur le support mais des problèmes de pureté des analytes peuvent survenir, liés aux limites des rendements de synthèse des analytes.

D'autres méthodes proposent de préparer à l'avance les différents analytes qui peuvent être ainsi purifiés et de les répartir sur le support solide en des positions discrètes.

Le brevet US 6,110,426 propose une méthode pour réaliser ces biopuces à l'aide d'un capillaire que l'on met en contact sur une surface solide pour délivrer un volume contrôlé de liquide. Un contact effectif a lieu entre l'extrémité du capillaire et le support solide pour que la goutte se dépose par capillarité. De même, le brevet US 6,083,763 décrit une méthode et un appareil pour la fabrication de biopuces. Il s'agit d'un ensemble de capillaires coulissant dans un dispositif de façon à compenser les différences de hauteur de chacun d'eux. Ils sont amenés au contact d'une surface plane pour le dépôt par capillarité d'oligonucléotides spécifiques. Ces méthodes par contact impliquent une grande précision dans le mouvement du capillaire et des supports solides parfaitement plans.

D'autres techniques résolvent ce problème du contact comme par exemple le brevet US 6,083,762 qui propose une système de répartition de gouttes comprenant un

microdispenseur couplé à un transducteur piézo-électrique pour éjecter des volumes de goutte inférieurs au nanolitre sur une surface solide. Un résultat semblable est obtenu en appliquant une source chaude sur la paroi d'un capillaire pour former une bulle qui éjecte un volume défini de solution (voir T. Okamoto et al., Nature Biotechnology, 18, p438-441, 2000).

Dans toutes ces techniques, les résultats obtenus sont satisfaisants et permettent le dépôt de quantités de solution très faibles de l'ordre du picolitre, mais l'appareillage utilisé est complexe et donc le coût de fabrication est élevé. Il y a donc besoin de techniques simples pour permettre le dépôt de solutions d'analytes sur support. Dans un certain nombre de cas où le nombre d'analytes ne doit pas être très élevé, de l'ordre d'une dizaine à quelques centaines, il n'est pas nécessaire d'avoir un volume de dépôt aussi faible que le picolitre et un volume de l'ordre du nanolitre suffit.

La présente invention décrit un procédé de dépôt d'une solution contenant au moins un analyte sur un support solide comprenant les étapes suivantes :

a) charger la solution dans au moins un réservoir d'un dispositif, chaque réservoir étant muni à une extrémité d'un orifice de sortie de dimensions adaptées pour que la solution ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir est au repos.

b) provoquer le déplacement du réservoir entre deux positions, une position dite de départ et une position dite d'arrivée, selon un axe, et

c) stopper le déplacement lorsque ledit réservoir se trouve en position d'arrivée pour créer un choc mécanique sur le réservoir et déposer, via l'orifice de sortie, une goutte de solution sur le support solide, ladite goutte se déplaçant dans l'air avant de se déposer sur le support solide.

De préférence, l'axe est sensiblement longitudinal, avantageusement sensiblement vertical, et la position de départ est une position haute, la position d'arrivée est une position basse par rapport à un référentiel vertical.

Le déplacement du réservoir est provoqué par tout moyen comme par exemple la gravité, un ressort ou tout type d'actionneur connu. La position d'arrivée du réservoir est déterminée à l'aide d'un moyen de butée. La fonction du moyen de butée est d'arrêter le déplacement du réservoir sans freinage préalable et donc de créer un choc mécanique par à coup. En particulier, il n'y a pas de déformation du réservoir lors du

choc mécanique. Le réservoir mis en mouvement entre la position de départ et la position d'arrivée subit lors du choc sur la butée une accélération négative dont la valeur est fonction des conditions initiales du mouvement, de la rigidité de la structure porteuse et des matériaux en contact au niveau de la butée lors de l'impact.

5 Par analyte on entend tout composé dont la mise en évidence et/ou l'identification et/ou la quantification présente un intérêt, et en particulier l'analyte possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique. A titre d'exemple, on peut citer comme analytes les polynucléotides, les
10 antigènes, les anticorps, les peptides, les protéines, les haptènes, les sucres, les ions, les métaux. Dans une première variante, les analytes peuvent être mis directement en solution. Dans une deuxième variante, les analytes peuvent être fixés sur des particules comme des latex ou des colloïdes (voir par exemple les brevets ou demandes de brevets de la demanderesse FR-B-2.773.416 ou FR-A-00/00799 ou les demandes
15 internationales WO 00/39587 et WO 99/67641 pour peu que les particules soient dispersées en milieu aqueux).

Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un analyte. Des matériaux naturels, de synthèse, modifiés ou non chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment des polymères tels que polychlorure de vinyle, polyéthylène, polystyrène, polyacrylate, polyamide, ou
20 copolymères à base de monomères vinyl aromatiques, alkylesters d'acides alpha-béta insaturés, esters d'acides carboxyliques insaturés, chlorure de vinylidène, diènes ou composés présentant des fonctions nitriles (acrylonitrile) ; des polymères de chlorure de vinyle et de propylène, polymère de chlorure de vinyle et acétate de vinyle ; copolymères à base de styrènes ou dérivés substitués du styrène ; des fibres
25 synthétiques telles que le nylon, la nitrocellulose ; des matériaux inorganiques tels que la silice, le verre, la céramique, le quartz ; des latex, des particules magnétiques ; des dérivés métalliques. Le support solide selon l'invention peut être, sans limitation, sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une feuille, d'un tube, d'un puits, de particules ou d'un support plan comme un wafer de silice ou silicium.
30 Préférentiellement, au moins une partie du support est plan comme un wafer de silicium ou le fond d'un puits d'une plaque de microtitration.

Le support solide est hydrophile et/ou hydrophobe en fonction des applications et de la nature de la solution contenant le ou les analytes. Par exemple, des zones hydrophiles sont utilisées pour le dépôt, lesdites zones hydrophiles étant délimitées par des zones hydrophobes ce qui permet de mieux contrôler le diamètre des spots.

5 Le réservoir est un contenant de forme quelconque qui peut contenir la solution d'analyte. En particulier, le réservoir a une forme allongée pour permettre d'associer un ensemble de réservoirs dans un espace réduit. A titre d'exemple, des réservoirs tels que décrit dans les brevets US 6,083,763, US 6,110,426 ou la demande de brevet EP-A-0.955.084 sont utilisables. Cette variante du procédé permet notamment la
10 fabrication d'une biopuce c'est-à-dire un ensemble d'au moins deux analytes différents fixés sur un support solide, ledit support ayant une taille généralement inférieure à 1 cm², et les analytes étant répartis sur le support solide en des positions discrètes.

L'orifice de sortie est dimensionné pour que le liquide ne s'écoule pas par gravité mais s'écoule par l'action d'un choc mécanique sur le réservoir. Le dimensionnement de
15 l'orifice permet en outre de contrôler le volume de goutte éjecté du réservoir, c'est-à-dire permet de calibrer le volume de solution en sortie du réservoir. Bien entendu, la dimension de l'orifice de sortie est fonction de divers paramètres comme la densité de la solution d'analyte, sa viscosité, l'hydrophilie ou l'hydrophobie de ladite solution et de celle du matériau utilisé pour la fabrication du réservoir et de l'orifice de sortie, et
20 l'accélération négative (décélération) lors de l'arrêt du réservoir dans sa position d'arrivée et enfin la variation de hauteur de la colonne de liquide dans le réservoir.

Dans une mode préféré de réalisation, la hauteur de liquide dans le réservoir est limitée à 20 mm, avantageusement est comprise entre 10 et 15 mm dans le cas où le haut de la colonne de liquide est à pression atmosphérique. Si le réservoir est bouché, il est
25 possible d'augmenter la hauteur de liquide dans le réservoir avec éventuellement un contrôle de la température.

Dans tous les cas, il n'y a pas contact entre le réservoir et le support solide sur lequel on veut déposer la solution. De même, il n'y pas contact entre le volume de solution à
30 dispenser, c'est-à-dire la goutte, quand celle-ci se décroche du réservoir, et le support solide ce qui évite les problèmes de capillarité de l'état de la technique pour déposer la

goutte sur le support solide. La goutte effectue donc un déplacement dans l'air présent entre l'espace séparant l'orifice de sortie du réservoir quand celui-ci est en position d'arrivée (ou position basse) et le support solide. Par air, on entend un milieu gazeux quelconque qui peut être de l'air mais aussi un gaz ou un mélange de gaz inertes comme l'azote et/ou l'argon.

Dans un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le déplacement du réservoir est sensiblement vertical par rapport au plan horizontal du support et le liquide se déplace par l'effet conjugué du choc mécanique et de la gravité. De préférence, le déplacement est vertical.

L'orifice peut être d'une forme quelconque pour peu que la solution d'analyte ne s'écoule pas par gravité lorsque le réservoir est au repos ou lorsque le réservoir est mû de la position d'arrivée à la position de départ (dans le cas du réarmement du dispositif). C'est cette définition complète qu'il convient de donner à l'expression « lorsque le réservoir est au repos ». Par exemple, l'orifice est un trou de diamètre compris entre 10 et 500 μm de préférence compris entre 25 et 250 μm .

Le volume de solution par goutte est compris entre 0,5 nanolitre et 1 microlitre, préférentiellement entre 1 nanolitre et 200 nanolitres.

Dans un mode particulier du procédé, le déplacement agit sur un seul réservoir.

Dans un mode préféré de réalisation du procédé, le déplacement agit sur moins deux réservoirs et le déplacement des réservoirs est simultané.

De préférence, chaque réservoir contient des analytes différents.

Dans un mode particulier de réalisation du procédé, le procédé comprend une étape supplémentaire d) qui consiste à répéter au moins une fois les étapes b) et c) c'est à dire :

b) provoquer le déplacement du réservoir entre deux positions, une position dite de départ et une position dite d'arrivée, selon un axe et

c) stopper le déplacement lorsque ledit réservoir se trouve en position d'arrivée pour créer un choc mécanique sur le réservoir et déposer, via l'orifice de sortie, une

goutte de solution sur le support solide, ladite goutte se déplaçant dans l'air avant de se déposer sur le support solide.

Dans un autre mode particulier de réalisation du procédé, le procédé comprend une
5 étape supplémentaire d) qui consiste à répéter au moins une fois les étapes a) à c) c'est à dire :

a) charger la solution dans au moins un réservoir d'un dispositif, chaque réservoir étant muni à une extrémité d'un orifice de sortie de dimensions adaptées pour que la solution ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir est au repos.

10 b) provoquer le déplacement du réservoir entre deux positions, une position dite de départ et une position dite d'arrivée, selon un axe et

c) stopper le déplacement lorsque ledit réservoir se trouve en position d'arrivée pour créer un choc mécanique sur le réservoir et déposer, via l'orifice de sortie, une goutte de solution sur le support solide, ladite goutte se déplaçant dans l'air avant de se
15 déposer sur le support solide.

Notamment lors de l'opération d), le déplacement génère le dépôt de goutte(s) dont la position est indépendante et sans contact avec toute autre goutte précédemment déposée. Le procédé permet ainsi de déposer un ensemble de gouttes sur une surface.
20 Ainsi dans le procédé, les spots, générés par les gouttes après séchage des solutions sur le support solide, ne se touchent pas. Par exemple, le dispositif est positionné de manière décalé par rapport à la position précédente ce décalage étant égal à au moins une fois le diamètre d'un spot sur le support solide.

Dans une première variante, le procédé permet de réaliser le dépôt du même analyte à
25 des positions discrètes sur le support solide pour effectuer une multiplicité de tests à partir du même analyte.

Dans une deuxième variante, le procédé permet de réaliser le dépôt d'analytes différents en des positions discrètes et différentes sur le support solide pour réaliser par exemple un test de multidétection. Un exemple de test en multidétection est donné par
30 exemple dans la demande de brevet de la demanderesse WO 93/02213 pour le typage HLA avec une multiplicité d'analytes qui sont des oligonucléotides de capture.

D'autres exemples de tests sont donnés dans le domaine de la génétique comme la demande de brevet EP-A-0.412.883 ou dans le domaine de l'infectieux avec les demandes de brevet WO 96/00298, WO 97/40193, WO 97/27332.

5 Dans un troisième variante du procédé, le dispositif se positionne au dessus d'un spot préalablement déposé et le dépôt d'une deuxième goutte permet d'augmenter la densité d'analytes à la surface.

Dans un quatrième variante, le procédé permet de déposer au moins deux analytes différents sur le même spot à partir d'au moins deux solutions différentes.

10 Les gouttes déposées sur le support solide sont par exemple séchées soit à l'air soit dans un caisson à vide selon des méthodes connues de l'homme du métier pour permettre la conservation des analytes.

Le chargement du réservoir avec la solution d'analytes est effectué extemporanément ou de manière prévisionnelle, afin de disposer d'autant de réservoirs que de configuration de distribution ou dépôt. Les solutions sont chargées manuellement avec
15 par exemple une micropipette ou de manière automatisée. Les réservoirs ainsi préparés sont stockés dans des conditions de stabilité des analytes avant utilisation.

La présente invention concerne également une biopuce fabriquée selon le procédé, c'est à dire un support solide sur lequel sont immobilisés au moins deux analytes différents en des positions discrètes, avantageusement au moins 4 analytes différents,
20 de préférence entre 4 et 100 analytes différents, ainsi qu'un kit de diagnostic comprenant au moins une biopuce fabriquée selon le procédé.

Un exemple d'application non limitatif des biopuces fabriquées selon le procédé de la présente invention concerne le diagnostic comme par exemple les immunoessais, quelque soit leur format, par analyse directe ou par compétition, ou bien la détection
25 et/ou la quantification d'acides nucléiques à partir d'un prélèvement quelconque contenant des acides nucléiques cibles. Dans un test diagnostique, la biopuce est utilisée préférentiellement comme dispositif de capture (voir le brevet de la demanderesse FR-B-2.707.010 ou les brevets US 4,981,783 ; US 5,700,637 ; US 5,445,934, ; US 5,744,305 ; US 5,807,522).

La présente invention concerne également un dispositif pour mettre en œuvre le procédé, ledit dispositif comprenant :

- 5 - au moins un réservoir contenant une solution d'analyte, chaque réservoir étant muni à une extrémité d'un orifice de sortie de dimensions adaptées pour que la solution d'analyte ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir est au repos, et chaque réservoir étant mobile le long d'un axe et pouvant adopter deux positions différentes par rapport à cet axe, une position dite de départ et une position dite d'arrivée,
- 10 - au moins un moyen de butée, ledit moyen de butée permettant de stopper le mouvement du réservoir en position d'arrivée tout en permettant à ladite solution d'analyte de s'écouler via l'orifice de sortie.

De préférence, l'axe est sensiblement vertical et la position de départ est une position haute et la position d'arrivée est une position basse par rapport à un référentiel vertical.

15 Le choc mécanique crée une décélération brutale sur le réservoir qui libère le volume de solution. La solution s'écoule sensiblement selon l'axe défini par la gravité. A noter que dans le mouvement de réarmement du dispositif, lorsque le réservoir est mû manuellement ou automatiquement de sa position basse vers sa position haute, celui ci subit une accélération suffisamment faible pour que le liquide ne s'écoule pas par

20 gravité. De même, la décélération subie par le réservoir en position haute lors du réarmement est suffisamment faible pour que la solution ne s'écoule pas.

L'orifice peut être d'une forme quelconque pour peu que la solution d'analyte ne s'écoule pas par gravité et que le volume de solution soit calibré. Par exemple, l'orifice

25 est un trou de diamètre compris entre 10 et 500 μm de préférence compris entre 25 et 250 μm . Pour les orifices non circulaires, le diamètre est représenté par la plus grande diagonale.

Le moyen de butée permet de maintenir un espace entre le support solide et l'orifice du

30 réservoir en position d'arrivée ledit espace étant supérieur à 2 fois le diamètre de l'orifice. Avantagusement, l'espace est réglable et compris entre 2 et 10 fois le

diamètre de l'orifice. Lors du déplacement du réservoir de la position de départ vers la position d'arrivée, le déplacement est stoppé brutalement par un moyen de butée.

Dans un mode de réalisation où le mouvement pour créer le choc mécanique est vertical, la hauteur de chute du réservoir entre la position haute et la position basse peut être de plusieurs centimètres, mais il sera montré dans les exemples qu'une hauteur de chute de quelques millimètres suffit pour créer un choc mécanique permettant la libération des gouttes du réservoir, si l'accélération négative sur le réservoir provoquée par ledit choc est suffisante.

Dans un mode de réalisation préféré, le dispositif contient au moins deux réservoirs qui ont les mêmes positions haute et basse selon l'axe vertical. Le mouvement simultané des réservoirs permet de déposer un ensemble de gouttes sur le support solide. De préférence, les réservoirs sont solidaires entre eux.

Dans une première variante du dispositif, le moyen de butée est entièrement fixé sur le dispositif.

Dans une deuxième variante de réalisation du dispositif, le support solide constitue une partie du moyen de butée du dispositif.

Le volume de solution par goutte est compris entre 0,5 nanolitre et 1 microlitre, préférentiellement entre 1 nanolitre et 200 nanolitres.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

La figure 1a représente une vue simplifiée d'un mode de réalisation du dispositif avec un seul réservoir.

La figure 1b représente une vue simplifiée d'un autre mode de réalisation du dispositif avec un seul réservoir.

Les figures 2a à 2c représentent un mode particulier de réalisation du procédé selon l'invention avec le dispositif de la figure 1a.

Les figures 3a à 3c représentent un mode particulier de réalisation du procédé selon l'invention avec le dispositif de la figure 1b.

La figure 4a représente une partie d'un dispositif selon l'invention plus complexe avec 4 réservoirs.

La figure 4b représente un détail d'un réservoir du dispositif de la figure 4a au niveau de l'orifice de sortie.

5 La figure 4c représente un coupe selon A-A de la figure 4a montrant le positionnement des 4 réservoirs.

La figure 5 représente le mode de fonctionnement du dispositif en regard d'un support solide en forme de plaque de microtitration.

10 Les figures 6a à 6b représentent une photographie du dépôt de solution en fonction de la taille de l'orifice percé dans le réservoir selon un mode de réalisation du procédé selon l'invention.

La figure 1a représente un dispositif simplifié illustrant le fonctionnement de l'invention. Le réservoir 1 est constitué d'un tube par exemple plastique. Un orifice 3
15 est pratiqué au fond du tube et le moyen de butée 5 est situé dans la partie inférieure du réservoir et a la forme d'une surépaisseur dans le matériau qui compose le réservoir.

Le mode de fonctionnement du procédé selon l'invention est représenté sur les figures 2a à 2c. Le réservoir est rempli d'une solution 2 contenant un analyte. Par déplacement
20 du réservoir 1, selon un axe vertical représenté par la flèche F, l'on crée un choc mécanique entre la butée 5 du réservoir et le support 6 ce qui a pour effet de libérer un volume précis de solution qui se dépose sur le support solide. La figure 2b illustre que la goutte de solution 7 se déplace dans l'air quand elle quitte le réservoir pour aboutir au dépôt d'un spot sur la figure 2c.

Les figures 6-a à 6-b montrent la reproductibilité du dépôt. Une solution de PBS tween colorée par de l'encre orange G est introduite dans un tube eppendorf (poly labo
25 référence 35341) percé en son fond d'un trou de diamètre variable de 50 μm (fig 6-a) ou 160 μm (fig 6-b). Une butée est réalisée dans le fond du tube en enlevant de la matière plastique sur un coté du tube comme représenté sur la figure 1a. Le tube est tapé sur une feuille de papier photo plusieurs fois pour créer un choc mécanique et
30 libérer des gouttes de solution. Les figures 6 montrent que le système de dépôt est reproductible même dans ces conditions manuelles et que le diamètre du trou permet de

faire varier le volume de solution et la taille du spot. L'échelle représentée sur les figures 6a à 6b est graduée par des valeurs exprimées en mm.

Il est donc possible de réaliser le dépôt de nanovolume de solution contenant un analyte sur une petite surface pour réaliser une biopuce avec par exemple différents
5 oligonucléotides qui permettent un diagnostic moléculaire.

Dans la figure 1b, la butée 5 est située sur le haut du réservoir 1 avec deux ergots. Dans ce cas, le support a la forme d'un puits de cuvette de microtitration et la butée vient au contact du bord supérieur du puits. Le dépôt est réalisé en appliquant une force F pour
10 déplacer le réservoir. Le choc mécanique est créé par le contact entre les ergots du moyen de butée. Dans ce mode de réalisation, la partie inférieure du réservoir sur laquelle se trouve l'orifice de sortie ne touche pas la partie inférieure du support solide, c'est à dire la partie plane où se dépose la goutte (figure 3a à 3c).

De nombreuses variantes de réalisation sont possibles sans sortir de la portée de la présente invention. Le seul principe à respecter est que l'orifice de sortie soit dimensionnée pour que le liquide ne s'écoule pas par gravité mais par l'action d'un choc mécanique sur le réservoir et que l'orifice de sortie soit dimensionné pour que le volume de solution éjecté soit calibré. Dans tous les cas, il n'y a jamais contact entre le liquide et le support solide sur lequel on veut déposer la solution. La goutte effectue
15 donc un déplacement dans l'air. L'espacement 13 entre le bord de l'orifice du réservoir et le support solide est au minimum supérieure à 2 fois le diamètre de l'orifice.

La figure 4a montre un autre mode de réalisation de l'invention pour permettre le dépôt de 4 solutions différentes d'analytes sur un support solide.

25 Le dispositif comporte quatre réservoirs 1 cylindriques montés verticalement autour d'un axe de guidage 4 et mobile le long de cet axe. Le positionnement équidistant des 4 réservoirs apparaît sur la figure 4c sur une vue en coupe. Un rubis 8 percé d'un trou 3 se trouve à l'extrémité du cylindre. Le trou a un diamètre de 50 μm . Une butée 5 est présente à l'extrémité de l'axe pour bloquer le mouvement vertical des cylindres. Le
30 fonctionnement de la butée apparaît sur la figure 4b. Un lamage est usiné dans la partie

inférieure du réservoir qui vient en butée sur le moyen 5. Comme cela sera expliqué sur la figure 5 le moyen de butée en entier est solidaire du dispositif.

Un doigt 9 d'immobilisation en rotation du réservoir est fixé sur la partie supérieure du dispositif. Une encoche réalisée dans la partie supérieure des réservoirs permet de bloquer la rotation par rapport au doigt 9 (figure 4c).

Le dispositif plus complet est représenté sur la figure 5.

Les quatre réservoirs sont maintenus en position haute par un moyen de blocage comme un cliquet 10. L'ensemble des réservoirs en position haute est représentée en pointillés sur la figure 5. Lorsque ce moyen est débloqué par un levier de commande 12, les 4 cylindres tombent par l'action de la gravité sur une hauteur de quelques millimètres le long de l'axe 4 et le mouvement des réservoirs est bloqué en position basse par la butée 5 créant ainsi une décélération brutale et donc un choc mécanique. Les réservoirs usinés en métal ont ensemble un mouvement à vitesse suffisante le long de l'axe 4 pour créer un choc mécanique au contact de la butée elle aussi usinée en métal. Les matériaux du réservoir et de la butée ainsi que la rigidité de la structure porteuse contribuent à l'intensité du choc attendu. D'autres matériaux sont utilisables comme le plastique ou le verre. Dans le cas où la quantité de mouvement du réservoir ou de l'ensemble de réservoir (c'est à dire le produit de la masse par la vitesse) est insuffisante par elle-même, un moyen d'accélération comme un ressort est ajouté sur le dispositif. La hauteur de déplacement des réservoirs est un moyen supplémentaire pour créer cet accroissement de la quantité de mouvement et les conditions précises sont déterminées par l'homme du métier au cas par cas. Un espacement de 500 μm est présent entre le support solide plan 6 qui réceptionne les gouttes de solution et l'orifice 3 du réservoir non représenté sur la figure 5. Les 4 gouttes de solution tombent simultanément sur le support solide. La hauteur de chute du réservoir est variable et réglable par l'intermédiaire d'un pallier 14. L'espacement de 500 μm est assuré par des pieds coniques 15 qui se positionnent dans les puits de la plaque de microtitration représentée sur la figure 5.

Pour vérifier la reproductibilité du dépôt, les 4 réservoirs du dispositif de la figure 5 sont remplis avec une solution d'orange G à 5mg/ml dans un tampon PBS 4x

(phosphate de sodium 200 mM pH 7,0, NaCl 600 mM). La hauteur de chute est réglée à 10mm. Le support solide est une plaque de microtitration NUNC référence 439454 en polystyrène. Le dépôt est répété 8 fois sur le fond d'un puits de la plaque. La taille des spots, mesurée sous microscope est comprise entre 149 et 179 μm avec un

5 coefficient de variation inférieur à 7% et un écart type inférieur à 10 μm .

Il est possible de répartir sur un disque de 4 mm de diamètre, délimité dans le fond d'un puits de plaque de microtitration, 16 spots de 160 μm de diamètre séparé par un distance comprise entre 600 et 700 μm sans risque de contamination.

Avec 16 analytes différents sur chaque spot, comme 16 sondes de capture pour le

10 typage HLA, il est possible de réaliser un typage dans un seul puits par un procédé très simple et peu coûteux.

REVENDICATIONS

5 1/ Procédé de dépôt d'une solution (2) contenant au moins un analyte sur un support solide (6) comprenant les étapes suivantes :

 a) charger la solution (2) dans au moins un réservoir (1) d'un dispositif, chaque réservoir étant muni à une extrémité d'un orifice de sortie (3) de dimensions adaptées pour que la solution ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir est au repos,

10 b) provoquer le déplacement du réservoir (1) entre deux positions, une position dite de départ et une position dite d'arrivée, selon un axe (4) et

 c) stopper le déplacement lorsque ledit réservoir (1) se trouve en position d'arrivée pour créer un choc mécanique sur le réservoir et déposer une goutte de solution sur le support solide, ladite goutte se déplaçant dans l'air avant de se déposer
15 sur le support solide.

 2/ Procédé selon la revendication 1 caractérisé par le fait que l'axe est sensiblement vertical et que la position de départ est une position haute et la position d'arrivée une position basse.

20

 3/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 caractérisé par le fait que le déplacement agit sur au moins deux réservoirs et que le déplacement des réservoirs est simultané.

25 4/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé par le fait que chaque réservoir contient des analytes différents.

 5/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé par le fait que le procédé comprend une étape supplémentaire d) qui consiste à répéter au
30 moins une fois les étapes a) à c).

6/ Procédé selon la revendication 5 caractérisé par le fait que lors de l'opération d) le déplacement génère le dépôt de goutte(s) dont la position est indépendante et sans contact avec toute autre goutte précédemment déposée.

5

7/ Dispositif pour mettre en œuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comprenant

au moins un réservoir (1) contenant une solution d'analyte (2), chaque réservoir étant muni à une extrémité d'un orifice de sortie (3) de dimensions adaptées pour que
10 la solution d'analyte ne s'écoule pas par gravité, lorsque le réservoir est au repos et chaque réservoir étant mobile le long d'un axe (4) et pouvant adopter deux positions différentes par rapport à cet axe, une position dite de départ et une position dite d'arrivée,

au moins un moyen de butée (5), ledit moyen de butée permettant de stopper le
15 mouvement du réservoir en position d'arrivée tout en permettant à ladite solution d'analyte de s'écouler via l'orifice de sortie.

8/ Dispositif selon la revendication 7 caractérisé par le fait que l'axe est sensiblement vertical et que la position de départ est une position haute et la position
20 d'arrivée une position basse et que la solution s'écoule sensiblement selon l'axe défini par la gravité.

9/ Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8 caractérisé par le fait que le diamètre de l'orifice de sortie (3) est compris entre 10 et 500 μm , de
25 préférence entre 25 et 250 μm .

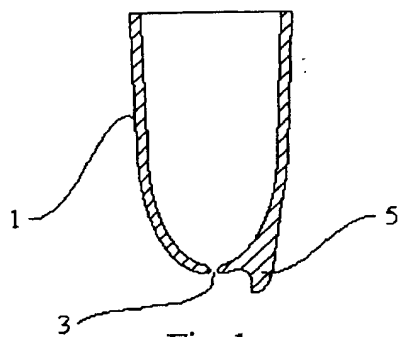
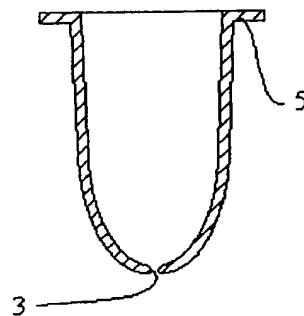
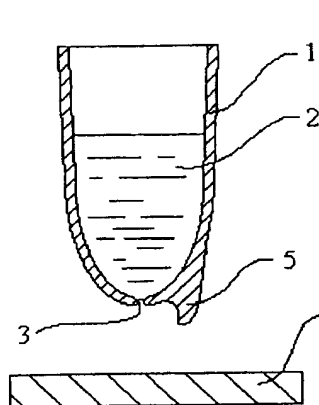
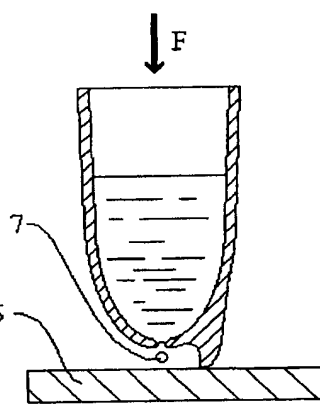
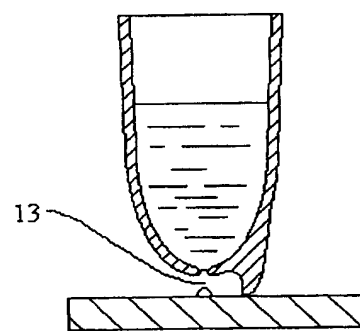
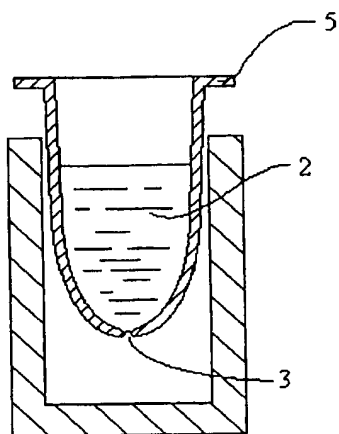
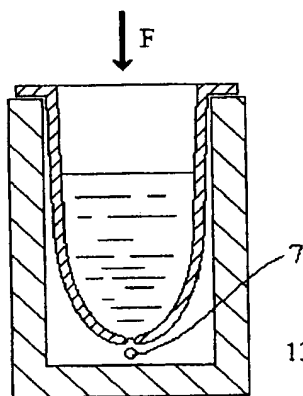
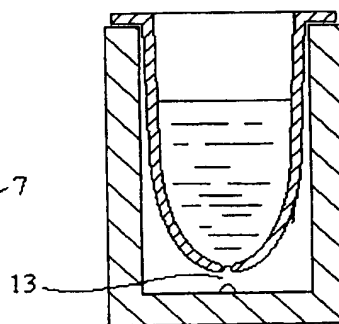
10/ Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 caractérisé par le fait que l'espace entre le support solide et l'orifice (3) du réservoir (1) en position d'arrivée est supérieure à 2 fois le diamètre de l'orifice (3) dudit réservoir (1).

30

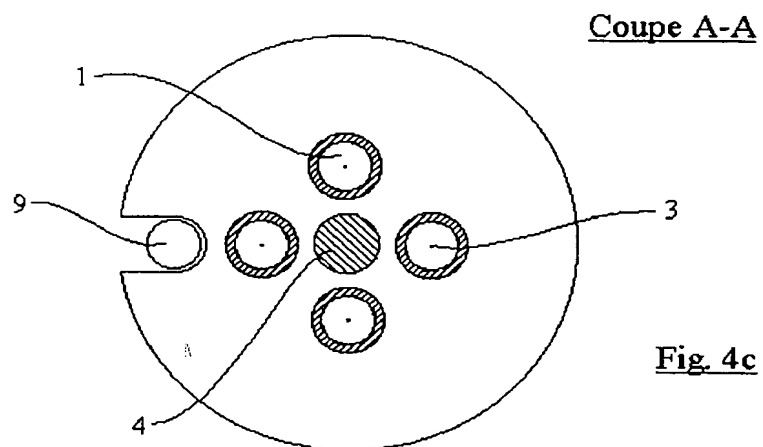
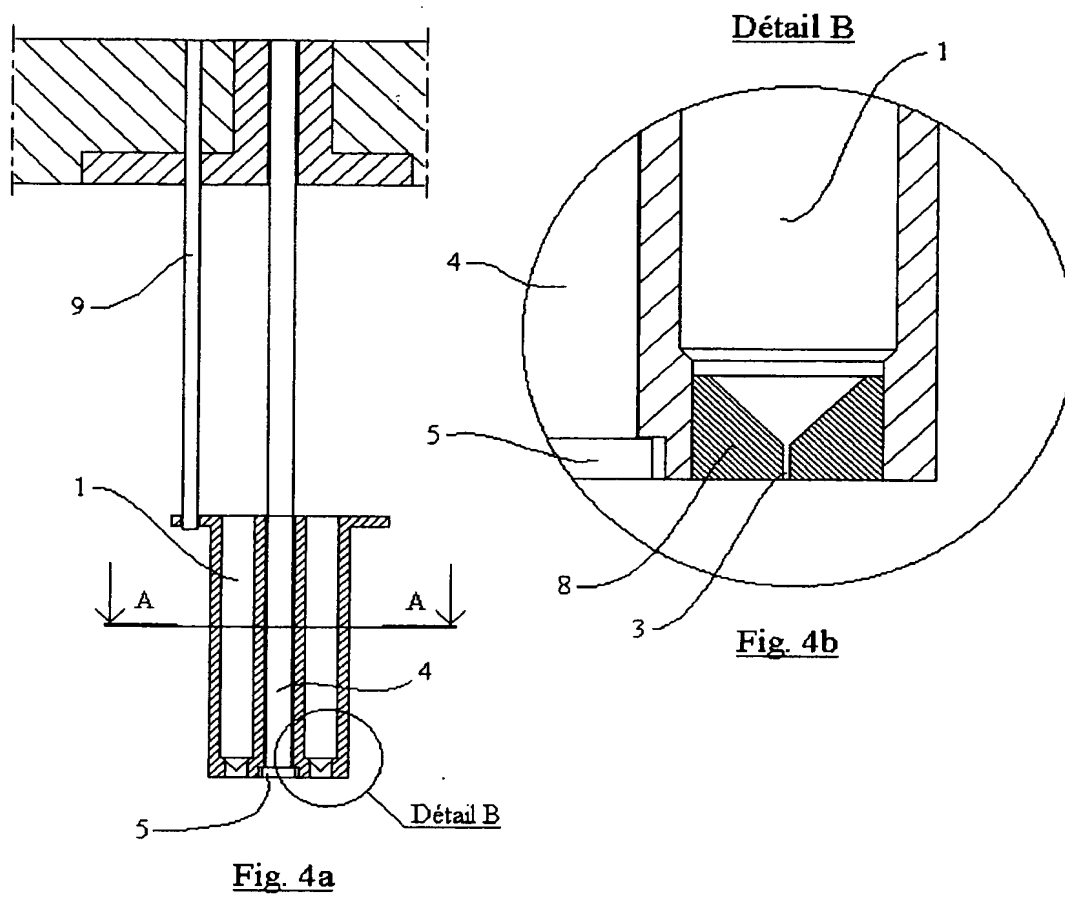
11/ Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé par le fait que le dispositif contient au moins deux réservoirs mobiles selon le même axe.

12/ Dispositif selon la revendication 11 caractérisé par le fait que les réservoirs
5 sont solidaires entre eux.

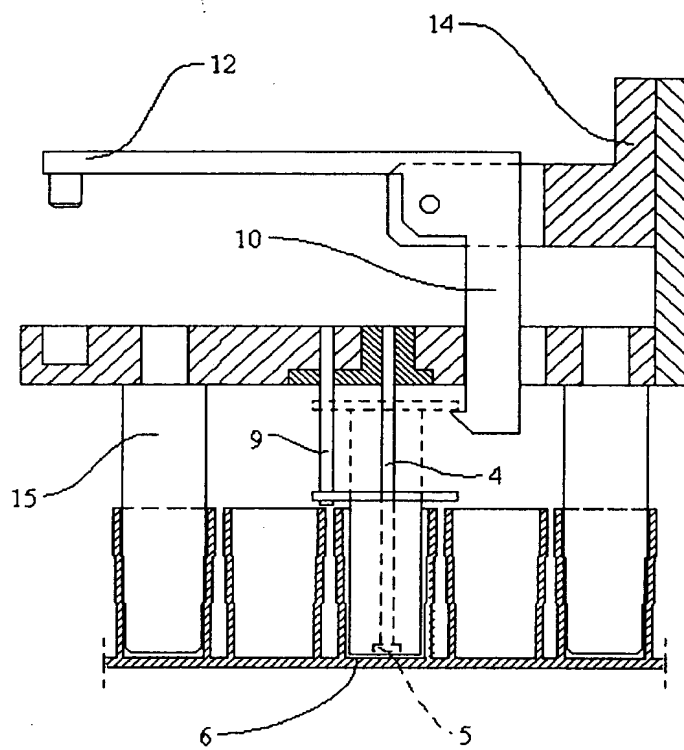
1 / 4

Fig. 1aFig. 1bFig. 2aFig. 2bFig. 2cFig. 3aFig. 3bFig. 3c

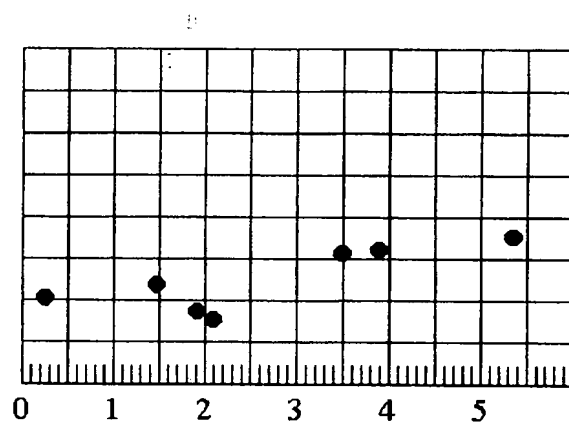
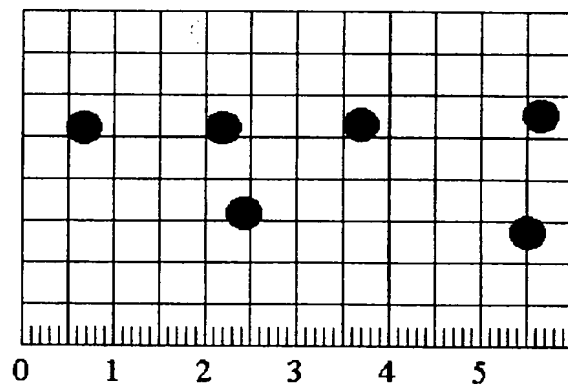
2 / 4



3 / 4

Fig. 5

4 / 4

Fig. 6aFig. 6b



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 596295
FR 0014691

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 00 25923 A (DAVIES MARTIN CLEMENT ;ELMES STUART ANTONY (GB); MILNE WILLIAM IRE) 11 mai 2000 (2000-05-11) * abrégé; revendications 14-21; figures 10,11 * * page 2, ligne 8 - page 2, ligne 18 * * page 7, ligne 8 - page 7, ligne 28 * * page 8, ligne 10 - page 8, ligne 23 *	1-12	G01N33/531 G01N33/543
A	US 6 116 297 A (FEYGIN ILYA) 12 septembre 2000 (2000-09-12) * abrégé; figures 1-6 * * colonne 3, ligne 7 - colonne 6, ligne 19 *	1-12	
A	US 5 334 353 A (BLATTNER FREDERICK R) 2 août 1994 (1994-08-02) * abrégé; figures 2,3 * * colonne 2, ligne 14 - colonne 2, ligne 37 * * colonne 5, ligne 26 - colonne 5, ligne 64 *	1,2,5-10	
A	US 5 964 381 A (LEYTES JOSEPH ET AL) 12 octobre 1999 (1999-10-12) * abrégé; figures 6-9 * * colonne 5, ligne 33 - colonne 6, ligne 67 *	1-4,7-12	
A	WO 97 15394 A (BAINS WILLIAM ARTHUR ;HOZEGO PETER JOHN (GB); SMITHKLINE BEECHAM) 1 mai 1997 (1997-05-01) * abrégé; figures 1-3 * * page 1, ligne 20 - page 2, ligne 16 * * page 4, ligne 15 - page 6, ligne 20; revendications 1-8 *	1-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			B01L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 juillet 2001		Runser, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.